

文章编号:1673-1689(2009)06-0832-08

培养基及培养条件对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的影响

王志新¹, 蔡宇杰¹, 李颜颜¹, 廖祥儒^{*1}, 张峰¹, 张大兵²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏 淮安 223001)

摘要: 从作者所在实验室保存的 3 株白腐真菌中筛选到一株液态发酵产漆酶的密孔菌 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1, 以漆酶活力为指标, 采用正交试验法, 优化了 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的培养基: 麸皮水煮液 60 g/L, 葡萄糖 60 g/L, 豆粕粉 15 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mmol/L; 培养条件: 初始 pH 3.0, 装液量 50 mL/250 mL, 30 °C、200 r/min 培养 13 d, 漆酶活力达 24.95 U/mL, 为优化前的 36.16 倍。

关键词: 密孔菌 SYBC-L1; 漆酶; 发酵; 优化

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Effect of Fermentation Medium and Conditions on Laccase Production by *Pycnoporus* sp. SYBC-L1

WANG Zhi-xin¹, CAI Yu-jie¹, LI Yan-yan¹,
LIAO Xiang-ru^{*1}, ZHANG Feng¹, ZHANG Da-bing²

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Hanbon Science & Technology Co. Ltd, Huai'an 223001, China)

Abstract: In this study, the nutritional and environmental conditions of a laccase produce strain, *Pycnoporus* sp. SYBC-L1, were investigated and optimized though single factor experiments and orthogonal experiments. The optimum conditions described as follows: wheat bran cooking liquor 60 g/L, glucose 60 g/L, soybean powder 15 g/L and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mmol/L, pH 3.0, temperature 30 °C, and culture volumn 50 mL/250 mL, respectively. With those optimum conditions, the laccase activity reached at 24.95 U/mL after 13 days culture.

Key words: *Pycnoporus* sp. SYBC-L1, laccase, fermentation, optimization

漆酶 (Laccase, ρ -diphenoloxidase, EC 1.10.3.2) 是一种含铜的多酚氧化酶, 能够催化多酚、多氨基苯等物质的氧化, 使之生成相应的苯醌和水, 是一组有广阔应用领域的酶类。漆酶最早发

收稿日期: 2008-12-31

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT0532)。

作者简介: 王志新 (1980-), 女, 河北辛集人, 发酵工程博士研究生, 主要从事白腐真菌漆酶方面的研究。

* 通讯作者: 廖祥儒 (1964-), 男, 江西南康人, 农学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学和分子生物学方面的研究。Email: liaoxiangru@163.com

现于日本漆树中,此后研究发现,漆酶广泛分布于多种植物、真菌以及少数昆虫和细菌中,但在自然界中,主要生产者还是白腐真菌^[1]。

漆酶具有特殊的催化性能和广泛的作用底物,因此,在木质素降解、纸浆漂白、染料废水脱色以及环境污染物的降解等领域有着广阔的应用前景,成为环境保护用酶研究的热点^[2-4]。此外,漆酶在食品方面的应用,也越来越多的引起研究者的兴趣。有研究报道,利用漆酶特异降解木质素的性质,用漆酶的生产菌株处理工农业废弃物,获得了一种功能性食品添加剂——膳食纤维^[5-6]。

漆酶可广泛应用于啤酒、饮料加工以及焙烤食品中,如可用于提高啤酒和果汁等饮料的稳定性,延长货架期;在面包加工方面,漆酶的使用可以增加面包体积,改善面包结构和柔软性,同时提高面团的机械强度和稳定性;此外,还可以处理食品工业中的废水等。漆酶的使用可以提高食品生产的质量和产量,但并不明显增加生产成本,也不会产生有毒物质。可见,漆酶在食品工业中同样存在巨大的应用潜力。

因此,筛选漆酶高产菌株是一项具有现实意义的工作。白腐菌由于其分泌漆酶的能力强而引起了广泛关注,因此国内外对漆酶的研究主要集中于白腐真菌,如糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、灵芝(*Ganoderma lucidum*)、杂色云芝(*Coriolus versicolor*)、变色栓菌(*Trametes versicolor*)等都有关于漆酶的报道^[7-8]。作者从实验室现有的特色菌株中筛选出一株具有较好漆酶分泌能力的菌株——密孔菌 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1,以 *Pycnoporus* sp. SYBE-L1 为研究对象,着重研究了液态培养对漆酶分泌的影响,以期今后的研究和工业应用提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌种

密孔菌 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1,层孔菌 *Phellinus* sp. SYBC-L2,丝核菌 *Rhizoctonia* sp. SYBC-M3;作者所在实验室筛选并保藏。

1.2 主要试剂

DMP(2,6-Dimethoxyphenol)、藜芦醇(veratryl alcohol)购自 Sigma 公司,麸皮和豆粕为市售,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

筛选培养基:PDA 培养基添加愈创木酚,终浓度为 0.5 mmol/L。

种子培养基:PDA 培养基,不加琼脂,pH 值自然。

产酶基础培养基(g/dL):葡萄糖 2,酒石酸铵 1, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{CaCl}_2 \cdot 0.007$ 5,微量元素 7 mL/L,按文献[9]培养基配制。

1.4 漆酶菌株的筛选

1.4.1 漆酶产生菌的初筛 取保存的 3 株菌,分别挑取部分菌丝接种于 PDA 筛选平板,30 ℃ 培养,观察菌落周围颜色的变化状况,根据菌落周围变色圈大小及颜色深浅进行初筛。

1.4.2 漆酶产生菌的复筛 种子培养 24 h,按体积分数 2% 的接种量接入 50 mL/250 mL 产酶基础培养基,分别静置于培养箱或摇床(200 r/min)中培养。

1.5 漆酶分泌条件的优化

1.5.1 碳氮源对漆酶分泌的影响 分别以不同的碳源和氮源代替产酶基础培养基中的葡萄糖和酒石酸铵,其它条件不变,30 ℃ 培养 13 d 后,测定漆酶活力。

1.5.2 铜离子浓度对漆酶分泌的影响 在产酶培养基中分别添加不同浓度的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0~3.5 mmol/L),30 ℃ 培养 13 d 后,测定漆酶活力。

1.5.3 正交试验设计 采用 $L_{16}(4^5)$,以碳源、氮源、铜离子几个主要影响因素做正交试验,优化 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的培养基。

1.5.4 发酵条件对漆酶分泌的影响 在优化培养基基础上,分别考察温度(25~35 ℃)、培养基初始 pH(2.0~6.0)和装液量(25~125 mL/250 mL)对漆酶分泌的影响。

1.6 酶活测定方法

1.6.1 漆酶酶活的测定(Lac) 按文献[10]方法进行,以每分钟氧化 1 μmol 的 DMP 生成 3,5,3',5'-四甲氧基二苯醌($\epsilon=49.6 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$)所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.6.2 锰过氧化物酶活的测定(MnP) 按文献[11]方法稍加改进,一个酶活单位(U)定义为在 30 ℃ 条件下每分钟转化 1 μmol 底物所需的酶量($\epsilon=11.59 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$)。

1.6.3 木质素过氧化物酶酶活的测定(LiP) 按文献[12]方法稍加改进,以每分钟氧化 1 μmol 藜芦醇生成藜芦醛所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.7 还原糖质量分数测定

采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[13]。

1.8 生物量测定

以菌丝体细胞干重表示^[14],发酵液经过离心、

洗涤后收集菌体,置 110 °C 烘箱,烘至恒重。

2 结果与讨论

2.1 漆酶产生菌的筛选

2.1.1 漆酶产生菌的初筛 所选 3 株白腐菌经愈创木酚平板显色,结果见图 1。*Pycnoporus* sp. SYBC-L1 和 *Phellinus* sp. SYBC-L2 菌落四周及底部均有红色变色圈产生,而 *Rhizoctonia* sp.

SYBC-M3 没有变色,可以初步判断前两株菌在生长过程中分泌了胞外漆酶,使得培养基内漆酶的特征底物被氧化分解,从而产生显色的氧化产物。

2.1.2 漆酶产生菌的复筛 为进一步验证 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 和 *Phellinus* sp. SYBC-L2 两株菌产漆酶的能力,对其进行了复筛培养,采用静置和摇床两种发酵方式培养,产酶情况见表 1。

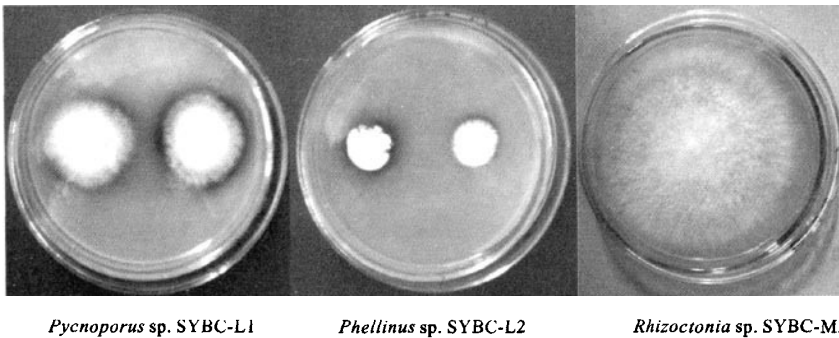


图 1 愈创木酚筛选平板图

Fig. 1 Primary screening picture of guaiacol as indicator

表 1 培养方式对漆酶分泌的影响

Tab. 1 Effect of culture mode on laccase production

菌株	漆酶活力/(U/L)	
	静置培养	摇床培养
<i>Pycnoporus</i> sp. SYBC-L1	26.81 ± 2.61	617.42 ± 29.19
<i>Phellinus</i> sp. SYBC-L2	497.54 ± 19.87	—

注:平均数 ± S. D, n = 3

由表 1 可知,这两株菌分泌漆酶的方式是不同的,*Pycnoporus* sp. SYBC-L1 为好氧菌,摇床培养时漆酶的分泌明显高于静置状态,静置培养时,*Pycnoporus* sp. SYBC-L1 在培养基表面形成一层菌膜,妨碍了氧气的传递,致使漆酶的产量很低。而 *Phellinus* sp. SYBC-L2 则相反,摇床培养过程中没有漆酶的分泌。

培养方式对漆酶的分泌有一定影响,与静置培养相比,摇床培养能够提高培养基的溶氧量,更适于菌体的快速生长和漆酶的分泌,作者确定以密孔菌 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 作为研究菌株。

2.2 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 的生长曲线和产酶曲线

采用产酶基础培养基,测定菌丝体生物量、还原糖质量浓度以及 3 种木质素降解酶的活力随培养时间的变化,见图 2。

图 2 显示,*Pycnoporus* sp. SYBC-L1 培养至第 5 天,发酵液中的还原糖开始迅速下降,至第 9 天大约下降至原来的 1/3,此时生物量达到最高,可见菌体的生长伴随着培养基的消耗。之后,随着培养时间的延长,还原糖质量浓度和生物量均开始缓慢下降。

对木质素降解酶分泌的研究发现,*Pycnoporus* sp. SYBC-L1 在生长过程中只分泌漆酶,而没有锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶的产生,酶系比较单一,这有利于后续的纯化操作。由图 2 可知,培养到第 9 天出现一个小的漆酶活力峰,第 13 天达到峰值,随着时间的延长,漆酶活力逐渐下降。这两个酶活峰可能是漆酶的两个同工酶,它们在分泌时间和分泌量上存在很大差异。由产酶曲线可得 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 的发酵周期应控制在 13 d 左右。

2.3 碳源对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的影响

2.3.1 碳源种类对漆酶分泌的影响 在以酒石酸铵为氮源的产酶基础培养基中添加 2 g/dL 的不同碳源,结果见表 2。

从表 2 可以看出,碳源对 *Pycnoporus* sp.

SYBC-L1 漆酶分泌的影响比较显著。在以麸皮水煮液为碳源时产酶最高,其次为麸皮和滤纸;单独以小分子糖类为碳源时菌体生长良好,但产酶较低;而以稻草、米糠、锯末为碳源时由于营养成分缺乏,菌体生长不良,产酶较低。

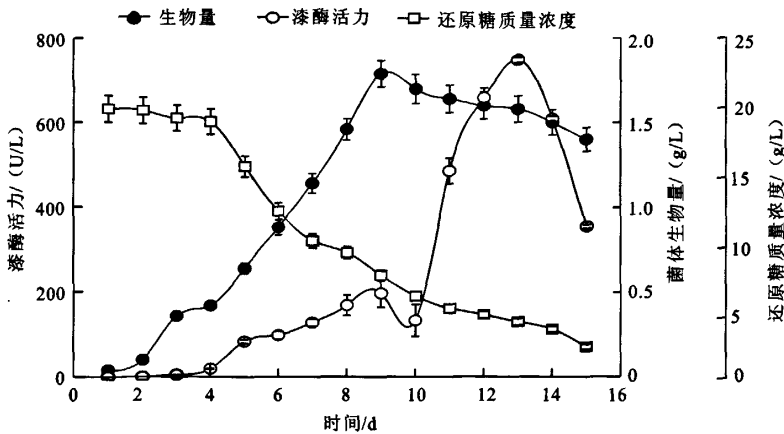


图 2 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 生长曲线和产酶曲线
Fig. 2 Growth and laccase production curves of *Pycnoporus* sp. SYBC-L1

表 2 碳源对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的影响

Tab. 2 Effect of carbon source on laccase production of *Pycnoporus* sp. SYBC-L1

碳源	相对酶活/%
葡萄糖	26.08
蔗糖	21.62
果糖	15.35
可溶性淀粉	31.76
麸皮	94.34
麸皮水煮液	100
滤纸	86.36
稻草	27.14
米糠	3.95
锯末	0

2.3.2 大分子碳源与小分子碳源的协同作用对漆酶分泌的影响

为进一步筛选有利于 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的碳源,进一步考察了大分子和小分子复合碳源对漆酶分泌的影响。图 3 表明,麸皮水煮液和葡萄糖按质量比 1:1 配合组成复合碳源时有利于产酶,且比单独以麸皮水煮液或葡萄糖为碳源

时活力高。

作者选用麸皮水煮液和葡萄糖的复合碳源作为 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的最佳碳源。

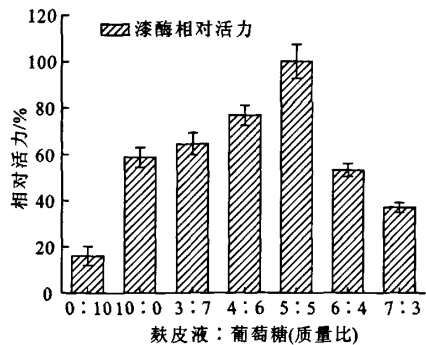


图 3 麸皮水煮液和葡萄糖质量比对漆酶分泌的影响
Fig. 3 Effect of the ratio of wheat bran water boiling liquid and glucose on laccase production

2.4 氮源对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的影响

2.4.1 氮源种类对漆酶分泌的影响 在以葡萄糖为碳源的产酶基础培养基中,添加 1 g/dL 的不同氮源,结果见表 3。

表 3 表明,在 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌时有机氮源明显高于无机氮源,其中以豆粕为氮源时的产酶最高,其次为酵母膏、牛肉膏、蛋白

脲;与有机氮源相比,无机氮源都不利于菌体产酶。因此,作者选用豆粕作为漆酶分泌的最佳氮源。

表3 氮源对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的影响

Tab.3 Effect of nitrogen source on laccase production of *Pycnoporus* sp. SYBC-L1

氮源	相对酶活/%
牛肉膏	56.32
蛋白胨	43.84
酵母膏	73.10
豆粕	100
酒石酸铵	1.65
氯化铵	14.15
硫酸铵	15.75
磷酸二氢铵	17.96

2.4.2 豆粕粒度对漆酶分泌的影响 豆粕的粒度大小对漆酶的分泌也存在一定的影响,分别以10、20、30、40、50目筛子对豆粕进行粒度分级,然后以不同粒度的豆粕为氮源进行发酵,见图4。

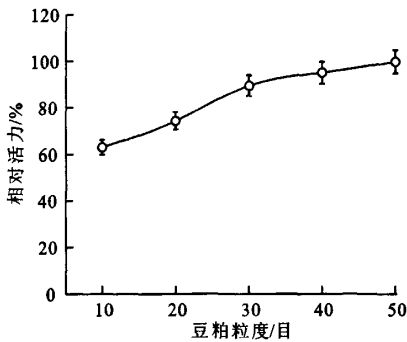


图4 豆粕粒度对漆酶分泌的影响

Fig.4 Effect of soybean powder size on laccase production

图4显示,豆粕粒度越小,越利于菌体利用,漆

酶产量也越高。因此作者以粉状豆粕作为 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的最佳氮源。

2.5 铜离子浓度对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的影响

漆酶作为一种含铜的多酚氧化酶,它的活性位点主要由4个3种不同类型的铜离子组成,因此铜离子是漆酶分泌的一个重要影响因素^[15]。在液体培养基中添加硫酸铜使 Cu^{2+} 终浓度分别为0~3.5 mmol/L,考察 Cu^{2+} 对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的影响,结果见图5。

图5说明, Cu^{2+} 的存在对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶的合成具有一定促进作用,但浓度过高反而对菌体具有一定的毒害作用,从而不利于产酶。图5显示, Cu^{2+} 浓度处于0.5~2.0 mmol/L 时利于漆酶的分泌,其中以1.5 mmol/L 时的活力最高,是不添加的3.46倍。

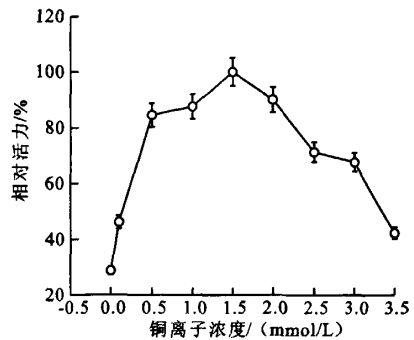


图5 铜离子浓度对漆酶分泌的影响

Fig.5 Effect of copper concentration on laccase production

2.6 正交试验

通过正交实验进一步研究发酵培养基的最优组合,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表,以麸皮水煮液、葡萄糖、豆粕粉和铜离子作为研究因素,试验结果与分析见表4。

表4 $L_{16}(4^5)$ 正交试验结果与分析

Tab.4 Result and analysis of $L_{16}(4^5)$ orthogonal design

试验号	A 麸皮水煮液/(g/dL)	B 葡萄糖/(g/dL)	C 豆粕粉/(g/dL)	D 铜离子浓度/(mmol/L)	漆酶活力/(U/mL)
1	1(4.5)	1(5.0)	1(2.5)	1(1.0)	19.52±0.61
2	1	2(4.5)	2(2.0)	2(1.5)	0.10±0.02
3	1	3(6.0)	3(1.5)	3(0.5)	12.98±0.94
4	1	4(5.5)	4(3.0)	4(2.0)	5.08±0.58
5	2(5.5)	1	2	3	1.76±0.18
6	2	2	1	4	5.35±0.57
7	2	3	4	1	7.55±0.66

续表 4

试验号	A 麸皮水煮液/ (g/dL)	B 葡萄糖/ (g/dL)	C 豆粕粉/ (g/dL)	D 铜离子浓度/ (mmol/L)	漆酶活力/ (U/mL)
8	2	4	3	2	18.72±0.87
9	3(6.0)	1	3	4	12.94±0.52
10	3	2	4	3	14.56±0.89
11	3	3	1	2	20.19±1.28
12	3	4	2	1	22.41±1.94
13	4(5.0)	1	4	2	13.55±0.81
14	4	2	3	1	14.69±0.64
15	4	3	2	4	21.11±0.28
16	4	4	1	3	13.57±0.91
均值 1	9.422	11.942	14.658	16.043	
均值 2	8.345	8.675	11.345	13.140	
均值 3	17.525	15.460	14.835	10.720	
均值 4	15.730	14.945	10.185	11.120	
极差 R	9.180	6.785	4.650	5.323	

注: mean ± S. D., n=3

由表 4 的极差分析结果可见,碳源对漆酶分泌的影响最大,氮源最小。各因素的影响程度为:A>B>D>C,培养基的最佳配方为 A₃B₃C₃D₁,即麸皮水煮液 60 g/L,葡萄糖 60 g/L,豆粕粉 15 g/L, CuSO₄ · 5H₂O 1.0 mmol/L。可见该菌在高碳低氮条件下培养有利于产酶,与文献[16]的结果一致。

2.7 优化培养基与基础培养基的比较

通过正交试验得到培养基的最佳组合为 A₃B₃C₃D₁,但这个组合是正交试验中没有的,需要进一步验证。表 5 结果表明,采用优化的培养基发酵,漆酶活力比试验号 12 活力高,因此确定培养基的最佳配方为 A₃B₃C₃D₁。

以麸皮水煮液 60 g/L,葡萄糖 60 g/L,豆粕粉 15 g/L, CuSO₄ · 5H₂O 1.0 mmol/L 最佳组合进行发酵试验,并与优化前的培养基进行比较,结果见表 5。由表 5 可知,培养基优化后的酶活力达到 (23.42±1.89) U/mL,为优化前的 33.94 倍。

表 5 优化培养基与基础培养基比较

Tab. 5 Comparison of optimal medium and basal medium

项目	酶活力/(U/mL)
正交试验号 12	21.92±1.63
培养基优化前	0.69±0.06
培养基优化后	23.42±1.89

注: mean ± S. D., n=3

2.8 培养温度对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的影响

采用上述优化培养基,在不同温度下发酵 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1。图 6 表明,最佳培养温度为 30 °C,35 °C 次之,比文献报道的最适温度 25 °C 或 28 °C 略高。图 6 显示,温度低于 28 °C 或大于 35 °C 漆酶分泌量降低,25 °C 培养时相对活力只有 22.65%,可见培养温度过高或过低都会影响漆酶的分泌。

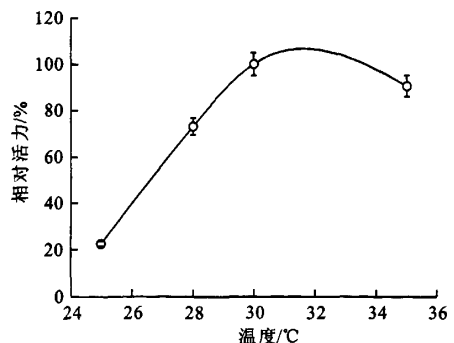


图 6 培养温度对漆酶分泌的影响

Fig. 6 Effect of temperature on laccase production

2.9 初始 pH 值对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的影响

培养基的初始 pH 值直接影响菌株的生长和代谢活动,一般白腐菌在酸性条件下生长较好且有较高的漆酶分泌能力^[17],因此作者调整培养基的初始

pH 值为 2.0~6.0, 考察其对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 产酶的影响, 结果见图 7。

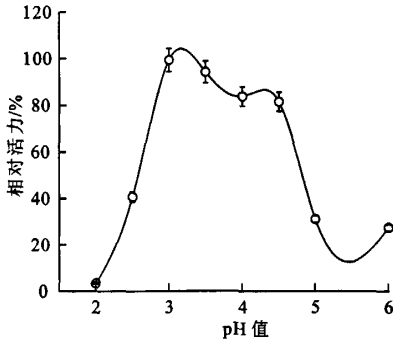


图 7 培养基 pH 值对漆酶分泌的影响

Fig. 7 Effect of pH value on laccase production

图 7 显示, pH 值为 3.0 时产酶最好, 可见偏酸条件利于 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶的分泌。当 pH 值小于 3.0 或大于 4.5 时, 酶活下降, 可能是由于初始 pH 值的变化使菌体生长受到了影响, 从而影响到漆酶的分泌。

2.10 装液量对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 漆酶分泌的影响

装液量是发酵液溶氧的一个间接指标。在 30 °C, 200 r/min 培养条件下, 采用不同的装液量, 250 mL 三角瓶中分别装 25、50、75、100、125 mL 优化培养基, 结果见图 8。

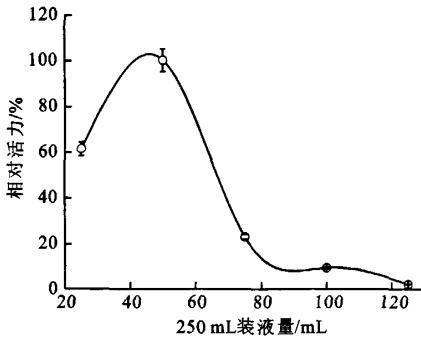


图 8 装液量对漆酶分泌的影响

Fig. 8 Effect of media volume on laccase production

由图 8 可知, 50 mL/250 mL 的摇瓶装液量最佳。装液量为 25 mL/250 mL 时, 相对活力为 61.29%; 而 75 mL/250 mL 的装液量, 其相对活力仅为 22.73%。装液量过高或过低均不利于 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶, 说明该菌株在漆酶合成中需要一定量的氧, 但过高的溶氧对产酶反而不利。因此, 确定 50 mL/250 mL 三角瓶装液量为漆酶分泌的最适条件。

Pycnoporus sp. SYBC-L1 在最佳培养基(麸皮水煮液 60 g/L, 葡萄糖 60 g/L, 豆粕粉 15 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mmol/L)及最佳培养条件(培养温度 30 °C, 初始 pH 3.0, 装液量为 50 mL/250 mL)下, 200 r/min 培养 13 d, 漆酶活力可达 24.95 U/mL, 为优化前的 36.16 倍。

3 结 语

从实验室保存的 3 株特色菌株中筛选到一株产漆酶的密孔菌 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1, 该菌株适于摇床培养, 且在生长过程中仅分泌漆酶, 而不产生木质素降解的其它两类酶(MnP 和 LiP)。在培养初期, *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 以菌体生长为主, 并未大量分泌漆酶。从第 5 天开始还原糖下降比较明显, 至第 9 天降至原来的 1/3, 此时菌体生物量达到最高, 并且开始大量分泌漆酶, 于第 13 天达到产酶高峰。

Pycnoporus sp. SYBC-L1 分泌漆酶的最佳培养基为: 麸皮水煮液 60 g/L, 葡萄糖 60 g/L, 豆粕粉 15 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mmol/L, 该菌在高碳低氮的条件下培养产酶较高; 最佳培养条件为: 培养温度 30 °C, 初始 pH 值 3.0, 250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基, 于 200 r/min 振荡培养 13 d, 漆酶活力达到 24.95 U/mL, 为优化前的 36.16 倍。

Pycnoporus sp. SYBC-L1 漆酶发酵所用的碳氮源均为工农业废弃物, 来源广泛且价格低廉, 工业生产时可以大大节约成本, 因此利用该菌株发酵漆酶具有很大的应用前景。

参考文献(References):

- [1] Riva S. Laccases; blue enzymes for green chemistry[J]. *Trends Biotechnology*, 2006, 24 (5): 219-226.
- [2] Mayer A M, Staples R C. Laccase; new functions for an old enzyme [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60: 551-565.
- [3] Couto S R, Herrera J L T. Industrial and biotechnological applications of laccases; A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24: 500-513.
- [4] 王园栋, 陈晓亚. 漆酶的性质、功能、催化机理和应用 [J]. *植物学通报*, 2003, 20(4): 469-475.

- WANG Guo-dong, CHEN Xiao-ya. The properties, functions, catalytic mechanism and applicability of laccase[J]. **Chinese Bulletin of Botany**, 2003, 20(4): 469-475. (in Chinese)
- [5] 湛斌, 唐雪明, 沈微, 等. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达 [J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4):43-46.
- CHEN Bin, TANG Xue-ming, SHEN Wei, et al. Cloning of a laccase gene from *Neurospora crassa* and its preliminary expression in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(4):43-46. (in Chinese)
- [6] Minussi R C, Pastore G M, Dura N. Potential applications of laccase in the food industry [J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2002, 13: 205-216.
- [7] Membrillo I, Sanchez C, Meneses M, et al. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains [J]. **Bioresource Technology**, 2008, 99: 7842-7847.
- [8] Lekounougou S, Mounquengui S, Dumarçay S, et al. Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization [J]. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2008, 61: 287-293.
- [9] Tien M, Kirk T K. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. **Methods in Enzymology**, 1988, 161B:238-249.
- [10] Claude J, Catherine M, Agathe B. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005, 66: 450-456.
- [11] Rogalski J, Szczodrak J, Janusz G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii* [J]. **Bioresource Technology**, 2006, 97: 469-476.
- [12] Ferreira-Leitao V S, Carvalho M E A, Bon E P S. Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: Comparison to reported methods [J]. **Dyes and Pigments**, 2007, 74: 230-236.
- [13] 王福荣. 生物工程分析与检验 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [14] 范文霞, 蔡友华, 刘学铭, 等. 毛云芝菌产漆酶液体培养条件的优化 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(3):88-93.
- FAN Wen-xia, CAI You-hua, LIU Xue-ming, et al. Optimization of liquid culture conditions for laccase production by *Coriolus hirsutus*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(3):88-93. (in Chinese)
- [15] Galhaup C, Haltrich D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001, 56: 225-232.
- [16] Revankar M S, Lele S S. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138 [J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2006, 22: 921-926.
- [17] 王蕾, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 一株碱性低温脂肪酶产生菌发酵条件的优化 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(3): 114-119.
- WANG Lei, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Optimization of fermentation conditions for a low-temperature lipase-producing strain [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(3):114-119. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)